

原 著

神経障害性疼痛は脊髄後角神経細胞の Cl^- ホメオスタシスを 変化させ GABA による抑制性反応を減弱させる

獨協医科大学医学部 麻酔科学

沼田 祐貴

要 旨 脊髄後角抑制性シナプスの変化が神経障害性疼痛を引き起こす機序を明らかにする目的で、膜電位イメージング法を用いて視覚化された GABA 灌流下の過分極を観察し、さらにリアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて神経障害性疼痛マウスの脊髄における Cl^- トランスポーターである NKCC1 および KCC2 の発現量を評価した。

ICR マウスの坐骨神経を部分結紮し、1 週間後にマウスの脊髄スライス標本を作製、膜電位感受性色素を用いて膜電位イメージングを行ったところ、GABA 灌流による過分極が対照群および非結紮側と比較して結紮側脊髄後角において有意に減弱していた。さらにリアルタイム定量 RT-PCR 法において坐骨神経部分結紮により脊髄後角 NKCC1 の発現量増加と KCC2 の発現量減少を認めた。

末梢神経損傷により脊髄後角 Cl^- トランスポーター発現量が変化することによって細胞内 Cl^- 濃度が増加し、GABA_A 受容体- Cl^- チャネル開口による Cl^- イオンの細胞内への流入が減少し、脊髄後角の過分極が減弱したと推測された。 Cl^- ホメオスタシスの変化による GABA 誘発性抑制性シナプスの減弱が神経障害性疼痛発症に関与していると考えられる。

Key Words : GABA_A 受容体- Cl^- チャネル, KCC2, NKCC1, 膜電位感受性色素, 膜電位イメージング

緒 言

神経細胞は細胞内外の種々のイオン濃度の能動的変化によりイオン選択的濃度勾配を形成し、細胞膜のイオンチャネルにイオン電流を発生させ、その電気的信号によりシナプス伝達を行うと考えられている¹⁾。神経回路網が複雑な情報処理を行うわれわれの脳では神経細胞のイオンホメオスタシスは脳の機能に極めて重要である。

中枢神経において最も主要な抑制性神経伝達物質である γ アミノ酪酸 (GABA) による伝達は GABA_A 受容体- Cl^- チャネルによる電気化学勾配に従った調節を受けており、神経細胞内への Cl^- の流入による膜電位の過分極がシナプスにおける抑制効果をもたらしていると考えられている¹⁾。シナプスにおける過分極は、細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) を細胞外よりもかなり低く保つ必要があ

る。これらのイオン濃度の調節のため、神経細胞膜には細胞内から細胞外へ Cl^- を運ぶ排出型の Cl^- トランスポーター (K^+ - Cl^- cotransporter, KCC2) と、逆に細胞外から細胞内に Cl^- を運ぶ取り込み型の Cl^- トランスポーター (Na^+ , K^+ -2 Cl^- cotransporter, NKCC1) が存在し、 $[\text{Cl}^-]_i$ のホメオスタシスを維持している。Blaesseらは Cl^- トランスポーターにより制御される Cl^- ホメオスタシスの変化が神経回路における GABA 作用の抑制および興奮の調節を行っているとは仮定した Cl^- ホメオダイナミクス説を提唱している²⁾。

脊髄における GABA の神経障害性疼痛発症への関与は以前から知られている。GABA 受容体の活性化により神経障害性疼痛が減弱したという報告があり、GABA 作動性シナプス伝達の変化が神経障害性疼痛発症の機序のひとつとして考えられている³⁾。また神経障害性疼痛により KCC2 のダウンレギュレーションが起これ、そのことによって GABA によるシナプス抑制が減弱することが示されている⁴⁾。このように Cl^- ホメオスタシスの変化による GABA を介した抑制性シナプスの減弱が神経障害性疼痛発症の原因であることが示唆されている。

平成 26 年 11 月 4 日受付, 平成 26 年 11 月 26 日受理
別刷請求先: 沼田祐貴

〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学医学部 麻酔科学

本研究では、神経障害性疼痛によって惹起される脊髄後角抑制性シナプス伝達の変化を明らかにする目的で、Seltzer法を用いて作製された神経障害性疼痛モデルの脊髄スライス標本を膜電位感受性色素で染色、その後、膜電位イメージング法によりGABA灌流下における脊髄後角の過分極の変化を観察した。さらにGABA作動性シナプス伝達の変化とCl⁻ホメオスタシスの関係を明らかにするために、リアルタイム定量RT-PCR法を用いて神経障害性疼痛発症マウスの脊髄後角におけるNKCC1およびKCC2の発現量の変化を評価した。

方 法

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

1. 対 象

生後3-4週のICR雄性マウスを使用した(20-30g)。飼育室の明暗周期を12時間とし、すべての実験は明期に行った。また餌、水分は自由に摂取できるようにした。

2. 神経障害性疼痛モデルの作製

マウスにハロセンの吸入による全身麻酔を施行し、結紮群に対してSeltzer法による左坐骨神経部分結紮を行った⁵⁾。また対照群(sham手術群)に対しては全身麻酔下に坐骨神経の露出のみを行った。また結紮7日目にvon Frey試験を行い、機械的刺激を10回加え、それに対する逃避行動を示した割合を測定し、部分結紮群についてアロディニアの発症を確認した。

3. 膜電位イメージングによる抑制性シナプス変化の観察

1) 脊髄スライス標本の作製

坐骨神経部分結紮の7日後にケタミン100mg/kgとキシラジン10mg/kgの腹腔内投与による全身麻酔下にマウスの椎弓切除を行い、脊髄を摘出した。摘出した脊髄は直ちに95%O₂、5%CO₂で飽和した4℃の氷冷クレブス液(組成:NaCl, 113mM;KCl, 3mM;NaHCO₃, 25mM;NaH₂PO₄, 1mM;CaCl₂, 2mM;MgCl₂, 1mM;D-glucose, 11mM;pH:7.4)に浸漬し、スライサー(Microslicer[®], D.S.K., Japan)を用いて厚さ450μmの脊髄スライス標本作製した。

2) 膜電位感受性色素による染色

5%CO₂/95%O₂をバブリングしているクレブス液を浸漬した濾紙上に、脊髄スライスを留置した直径13mmのメンブランフィルターを並べ、30分間静置した後、膜

電位感受性色素であるdi-4-ANEPPS(5mM)40μlにクレブス液480μlとFetal bovine serum 480μlを加えたものを100μlずつ滴下し、15~20分間暗所にて静置したのち、色素を洗浄した。

3) MiCAM2による膜電位変化の観察

スライス標本を記録用チャンバーに固定し、MiCAM02およびCCDカメラを用いた高速蛍光測定法で、脊髄後角における膜電位変化の評価を行った。クレブス液にはテトロドトキシン(0.3μM)を加えることで活動電位を遮断した。高速蛍光測定開始30秒後、GABA100μMを90秒間灌流し、脊髄後角における蛍光強度変化を計480秒間記録し、後角全体の蛍光強度変化の平均値について坐骨神経部分結紮群および対照群の左右で比較した。

4. リアルタイムRT-PCR法

リアルタイムRT-PCR法により、NKCC1およびKCC2の発現量の定量を行った。神経結紮1週間後に坐骨神経部分結紮側の腰部膨大部の脊髄後角を摘出し、アイソジェンを用いて脊髄後角よりNKCC1 mRNAおよびKCC2 mRNAを抽出した。その後、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。このcDNAからTaqMan probeを用いて、NKCC1およびKCC2の発現量を定量し、評価した。定量は非結紮マウスの腰部膨大部の脊髄後角をコントロールとし、ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHを用い、2^{-ΔΔCt}法によって比較定量した。

5. 統計解析

全ての結果は平均値±標準誤差で示し、対照群と坐骨神経部分結紮群における左右の後角の蛍光強度変化の比較には二元配置分散分析法(two-way analysis of variance: two-way ANOVA)を用いた。また事後の多重比較検定にはTukey法を用いた。統計処理は統計ソフトSPSSを使用し、統計的有意水準はP<0.05とした。

結 果

膜電位イメージング法による観察

膜電位イメージング法によるGABA灌流の結果を図1に示す。対照群の後角ではGABA灌流による蛍光強度変化の増加に左右差を認めなかった。一方、坐骨神経部分結紮マウスにおいて結紮側の後角では輝度の増加に有意な減少を認め(P<0.05)、坐骨神経部分結紮により、同側脊髄後角におけるGABA灌流により惹起される過分極が減弱しているのを確認した。さらに対照群の脊髄後

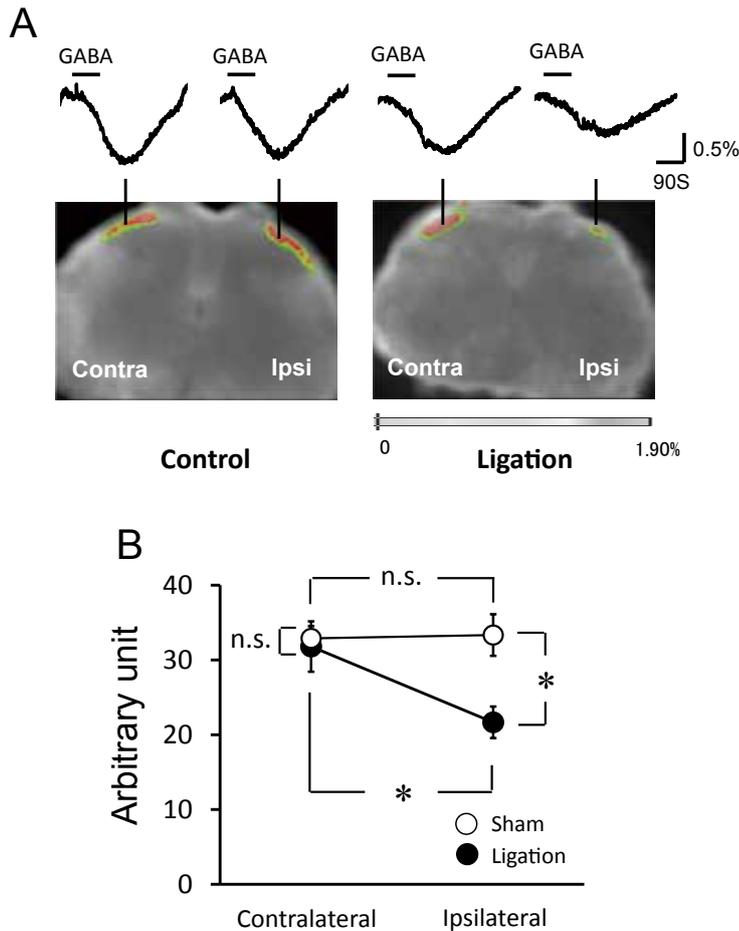


図1 膜電位イメージング法を用いたGABA灌流下における脊髄後角過分極の観察

図1AはGABA灌流下における対照群と結紮群の脊髄後角膜電位変化のイメージングを示す。対照群(左)ではGABA灌流による蛍光強度変化に左右差はなかったが、結紮群(右)では結紮同側(Ipsi)の蛍光強度変化が対側(Contra)に比して減弱しており、過分極が減弱していた。図1Bは各後角における蛍光強度変化を比較した結果である。対照群における左右蛍光強度は有意差がなかった。一方、結紮群では結紮側の蛍光強度が有意に減弱しており、過分極の減弱を認めた(* $P < 0.05$)。

角と比較してもGABAによる過分極が有意に減少していることを確認した($P < 0.05$) (対照群: $n = 5$, 結紮群: $n = 9$)。

リアルタイム定量RT-PCR法

リアルタイム定量RT-PCR法の結果を図2に示す。坐骨神経部分結紮群における脊髄後角NKCC1発現量は対照群と比べ増加していた($P < 0.05$)。一方、結紮群におけるKCC2発現量は対照群と比べ減少していた($P < 0.05$) (NKCC1: $n = 9$, KCC2: $n = 8$)。

考 察

神経障害性疼痛によって脊髄におけるGABA作動性シナプス伝達に変化が起こることは以前から知られている。Castro-Lopesらの研究では、末梢神経切断2週間後に同側後角におけるGABA受容体陽性細胞数が減少したと報告されている⁶⁾。本研究では、坐骨神経部分結紮同側の脊髄後角において、反対側および対照群の後角と比較して過分極が減弱していることが確認され、GABAの抑制性作用が減弱していた。このことは、Castro-

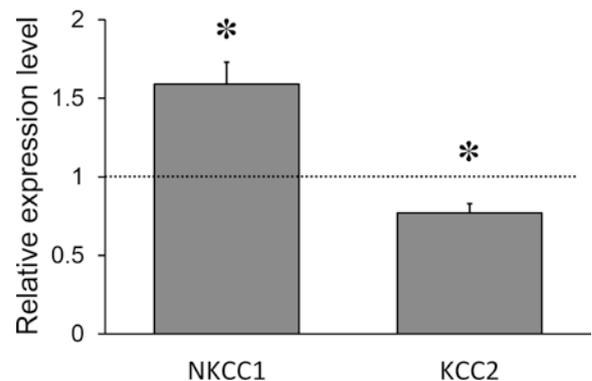


図2 定量リアルタイムRT-PCRの結脊髄後角におけるNKCC1およびKCC2発現量の変化を示す。対照群における各トランスポーター発現量を基準とした結紮後の相対的発現量は、NKCC1は有意に増加し(* $P < 0.05$)、KCC2は有意に減少していた(* $P < 0.05$)。

Lopesらの研究結果に矛盾しない。さらに今回、特定かつ複数の神経細胞の高速同時測定を可能にする膜電位イメージング法を行ったことにより、膜電位変化を基準にGABA作用の減弱を視覚的に確認することが可能であ

った。また Eaton らが行った研究では、末梢神経損傷 3 日後より 1 週間後まで脊髄後角 GABA 陽性細胞の数が両側性に減少し続けたと報告している⁷⁾。本研究では坐骨神経部分結紮 7 日後に測定を行い、非結紮側と対照群の後角における過分極を観察したところ有意差はなかった。しかし末梢神経結紮直後に膜電位イメージングによる観察を行えば非結紮側においても GABA による過分極の減弱が出現する可能性がある。さらに脊髄においてミクログリア由来の脳由来神経栄養因子 (BDNF) の作用減弱により GABA の抑制作用が減弱することが示されており、神経障害性疼痛発症の機序のひとつと考えられている⁸⁾。本研究同様に過去の多くの研究において、神経損傷により誘発される脊髄後角 GABA 作動性シナプス伝達の減弱が神経障害性疼痛の発症に関与していることを示している。

神経障害性疼痛を発症すると、アロディニアや痛覚過敏、難治性の自発痛を発症する。これにはケモカインの一種である CCL21 やミクログリアが関与し、 $[Cl^-]_i$ を変化させていると考えられている⁹⁻¹¹⁾。神経障害性疼痛モデルラットでは、アロディニア発現の経時変化に相関してミクログリアが活性化型に変化するとされている¹²⁾。また、末梢神経の損傷に反応して後根神経節 (DRG) ニューロンの細胞内では、ケモカインの一種である CCL21 が産生され、損傷 24 時間後には脊髄後角に到達し活性化ミクログリアに作用して P2X4 受容体 (ATP 受容体のサブタイプの一つ) の過剰発現に寄与する^{13,14)}。ATP が過剰発現した P2X4 受容体を刺激すると、活性化ミクログリアから脳由来神経栄養因子 (BDNF) が放出され、BDNF は脊髄後角第一層の二次ニューロンに働き、KCC2 の発現を抑える^{14,15)}。その結果、 $[Cl^-]_i$ が高まり、陰イオンに対する逆転電位が脱分極側にシフトする。この条件下では、触刺激等により介在ニューロンから放出された GABA の作用で Cl^- チャンネルが開くと、 Cl^- イオンは細胞内から細胞外へ流出し、ニューロンは脱分極する¹⁶⁾。これによって通常時は抑制的に働くべき GABA の二次ニューロンへの作用が興奮性に変化する。その結果、触刺激が痛みとなるアロディニア状態を呈すると考えられている。さらに本研究ではリアルタイム定量 RT-PCR 法にて NKCC1 の発現増加と KCC2 の発現減少が確認された。これらの機序により、脊髄後角ニューロンの Cl^- ホメオスタシスを変化させ、GABA の抑制性作用を減弱させることが神経障害性疼痛の要因と考えられる。

侵害受容により KCC2 の発現が抑制されることは以前より報告されている。神経障害性疼痛モデル動物だけでなく、発達初期の神経細胞においても NKCC1 が KCC2

より優位に働き、 $[Cl^-]_i$ が高く維持されているため GABA 作動性 Cl^- チャンネルが開くと、脱分極 (負電荷減少) が起こると言われている。ラット関節炎モデルを用いた研究では、慢性炎症により NKCC1 発現量は増加していたが、KCC2 発現は急性期では減少し、慢性化すると徐々に正常レベルに戻ったと報告している¹⁷⁾。また末梢神経損傷により DRG における NKCC1 の増加および脊髄における KCC2 の減少が観察され、これらのトランスポーター発現の変化が、痛み刺激が投射する上位中枢である視床の後外側腹側核 (VPL) や体性感覚皮質 (S1) における興奮性変化をもたらすことが証明されている¹⁸⁾。免疫組織学的手法により脊髄後角 GABA および KCC2 発現を観察した研究では、神経損傷直後 3 日では KCC2 発現は変わらなかったが、損傷 16 日後には KCC2 発現が減少していた。加えて、GABA 免疫活性は損傷 3 日後では低下していたが 16 日後では逆に増加したと報告している¹⁹⁾。この研究では GABA と KCC2 の 2 つの因子の変化が関連することにより神経障害性疼痛の発症および進行に関与している可能性を示している。本研究では脊髄後角における KCC2 の発現量減少のみならず NKCC1 の発現増加も確認が可能であり、これらのトランスポーター発現量の変化により GABA を介した抑制性シナプス伝達が減弱されたと考えられる。これらの報告からも、GABA および Cl^- ホメオスタシスに関与しているトランスポーターが中枢神経系における複雑な変化をもたらし、神経障害性疼痛発症の機序のひとつとなっていると考えられる。

利尿剤である bumetanide が NKCC1 を阻害することに着目し、 $[Cl^-]_i$ を低下させて GABA 作用を興奮性から抑制性に転じさせる研究がすでに行われている^{18,20)}。この効果を利用することで神経障害性疼痛の治療にも応用できる可能性がある。近年、ラットを用いた研究では神経障害性疼痛を誘発させることが知られている paclitaxel 投与によるアロディニア発症に bumetanide による NKCC1 阻害が有効だったことが報告されている²¹⁾。今後さらに GABA と Cl^- ホメオスタシスの関係について多くの科学的根拠を積み重ねて慎重に検討を行い、GABA_A 受容体- Cl^- チャンネルに作用する薬剤の開発により、神経障害性疼痛治療への有益性が見出されることが期待される。

結 論

本研究では、神経障害性疼痛によって起こる脊髄後角での GABA 誘発性過分極の減弱および同側脊髄後角神経細胞における Cl^- トランスポーター NKCC1 の発現増加、KCC2 の発現減少を観察した。 Cl^- ホメオスタシス

の変化による GABA を介したシナプス抑制の減弱を認め、神経障害性疼痛の発症メカニズムのひとつと考えられた。

文 献

- 1) 福田敦夫：幼少時の麻酔暴露による脳障害と脳発達過程の興奮性 GABA 作用. 日本臨床麻酔学会誌 **31** : 1-11, 2011.
- 2) Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, et al : Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* **61** : 820-838, 2009.
- 3) Gwak YS, Tan HY, Nam TS, et al : Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* **23** : 1111-1124, 2006.
- 4) Lu Y, Zheng J, Xiong L, et al : Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat. *J Physiol* **586** : 5701-5715, 2008.
- 5) Seltzer Z, Dubner R, Shir Y : A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43** : 205-218, 1990.
- 6) Castro-Lopes JM, Tavares I, Coimbra A : GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. *Brain Res* **620** : 287-291, 1993.
- 7) Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, et al : Changes in GAD- and GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J Chem Neuroanat* **16** : 57-72, 1998.
- 8) Lever I, Cunningham J, Grist J, et al : Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *Eur J Neurosci* **18** : 1169-1174, 2003.
- 9) de Jong EK, Dijkstra IM, Hensens M, et al : Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons : a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J Neurosci* **25** : 7548-7557, 2005.
- 10) Biber K, Tsuda M, Saitoh-Tozaki H, et al : Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development. *EMBO J* **30** : 1864-1873, 2011.
- 11) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al : P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424** : 778-783, 2003.
- 12) 井上和秀：神経障害性疼痛発症メカニズムとその制御. *臨床神経学* **49** : 779-782, 2009.
- 13) Biber K, Vinet J, Boddeke HW : Neuron-microglia signaling : chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol* **198** : 69-74, 2008.
- 14) 井上和秀：ニューロサイエンスの最新情報 痛みとミクログリア. *Clinical Neuroscience* **31** : 484-485, 2013.
- 15) Coull JA, Boudreau D, Bachand K, et al : Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* **424** : 938-942, 2003.
- 16) Coull JA, Beggs S, Boudreau D, et al : BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **438** : 1017-1021, 2005.
- 17) Morales-Aza BM, Chillingworth NL, Payne JA, et al : Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol Dis* **17** : 62-69, 2004.
- 18) Mòdol L, Cobiañchi S, Navarro X : Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain* **155** : 1577-1590, 2014.
- 19) Janssen SP, Truin M, Van Kleef M, et al : Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* **184** : 183-194, 2011.
- 20) Hasbargen T, Ahmed MM, Miranpuri G, et al : Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* **1198** : 168-172, 2010.
- 21) Chen SR, Zhu L, Chen H, et al : Increased Spinal Cord NKCC1 Activity Contributes to Impairment of Synaptic Inhibition in Paclitaxel-induced Neuropathic Pain. *J Biol Chem* **289** : 31111-31120, 2014.

The Effect of Peripheral Nerve Injury on GABAergic Inhibitory Synaptic Transmission in the Spinal Cord Dorsal Horn

Yuuki Numata

Department of Anesthesiology, Dokkyo Medical University

To clarify the influence of the depression of the spinal GABAergic inhibitory synaptic transmission on development of neuropathic pain, we observed optical imaging of hyperpolarization produced by GABA in the spinal cord dorsal horn using voltage-sensitive dye. Furthermore, the expression of NKCC1 (Na-K-Cl cotransporter) and KCC2 (K-Cl cotransporter) in mouse spinal cord dorsal horn was analyzed by quantitative real-time RT-PCR method. The sciatic nerve partial ligation was performed in 6 to 8 weeks male ICR mice, according to Seltzer's method under halothane anesthesia. The spinal cord slices were prepared one week after ligation, and incubated for 20 min with a di-4-ANEPPS to use optical imaging. After rinsing, the slices were placed into the recording chamber on the microscope stage and perfused by Krebs' solution with tetrodotoxin, continuously. Fluorescent changes of di-4-ANEPPS in the spinal cord dorsal horn were measured using MiCAM02.

During the recording, GABA (100 μ M) was perfused for 90 sec. The visualized hyperpolarization at the spinal cord dorsal horn in ipsilateral side by the perfusion of GABA was attenuated in ligated mouse. However, this phenomenon was not observed at contralateral side in ligated mouse, and in sham-operated mouse. Furthermore, the expression of NKCC1 was increased and KCC2 was decreased in the spinal dorsal horn after sciatic nerve ligation. These findings suggest that nerve injury may lead to the up-regulation of NKCC1 and down-regulation of KCC2 in the spinal dorsal horn and increase of intracellular Cl⁻ concentration, consequently. As a result of increase of intracellular Cl⁻, hyperpolarization produced by GABA was alleviated. Inhibition of hyperpolarization due to homeostatic changes of Cl⁻ in the dorsal horn neuron may have a pivotal role for development of neuropathic pain.